第8卷 第4期 动物学研究 Vol.8, No.4
1987年11月 ZOOLOGICAL RESEARCH Nov., 1987

# 青鱼 *Mylopharyngodon piceus* 出血病的初步研究

翟子玉 柯鸿文 俞豪祥 顾震南 李秀珍 曹淑琴
（上海市水产研究所）

龚明耀
（上海市水产技术推广站）

## 摘要

青鱼出血病是危害青鱼最严重的疾病之一，尤以二龄为甚。通过人工注射免疫后，可使青鱼的成活率由原来20%左右提高至60—90%，个别的可达 98.98%。通过病鱼肾脏组织超薄切片电镜观察，首次发现病毒颗粒（直径为50—56毫微米）的存在，经0.15微米孔径的滤膜过滤的病原悬液可反复在鱼体内传3—4代，使健康鱼发病。因此，认为青鱼出血病是病毒引起的疾病。

**关键词** 青鱼 出血病 病毒

## 前言

青鱼出血病一般流行于江苏、浙江及上海市郊等地，特别在饲养青鱼有悠久历史的江苏，该病更为严重，通常青鱼的成活率只有20%左右。因此，每年青鱼发病季节，养殖技工便束手无策。由于二龄青鱼多病，成活率又低，所以有些养鱼场不愿饲养青鱼，致使青鱼产量下降。

早在五十年代，王德铭（1956，1958）曾作过青鱼病的研究。近几年来，随着

*本工作得到松江、青浦、金山县的大力支持；超薄切片及电镜工作蒙第二军区大学顾永磐等同志，上海第二医学院朱建国等同志，上海市卫生局测试站钱澄怀、陆秀英同志完成；中国科学院细胞生物研究所姚曾序副研究员、张哲夫同志，中国科学院上海昆虫研究所尹文英研究员，中山大学徐豪、马淑懿副教授给予指导和帮助；本所钱公威、郝思平同志协助做了部分试验，程洪迪同志完成相片。特此一并致谢。
本文1986年8月26日收到，1986年11月10日收到修改稿。

青鱼养殖的发展，孙建中等（1981）、王精豹等（1982，青鱼出血病的初步研究。鱼病简讯，第3期）、翟子玉等（1982）对青鱼病也作了不同程度的研究，但他们均未确证青鱼出血病是病毒所引起。

关于鱼类病毒病的研究，国外早在五十年代就开始了。据 Wolf 和 Mann(1980) 报道，国外已有32种鱼类病毒病，其中已分离到的就有17种，还有15种病毒病只在透射电镜中观察到。这些病毒大多数是属于冷水性或海产鱼类的，只有少数才属于淡水鱼类的。直至目前为止，未见国内、外关于青鱼出血病是由病毒而引起的报道。

本文仅就几年来的试验结果作如下初步报道。

## 材料和方法

**1.健康材料鱼来源** 室内试验：试验前将鱼种（1或2龄）从池中捕出后暂养于室内，经几天观察认为正常时才开始试验。

室外试验：放养二龄青鱼时，采用金属连续注射器将鱼逐尾进行腹腔免疫注射，年底出塘时统计成活率。

**2.病原材料** 从各养殖场收集濒死或刚死的病鱼，将其肝、脾、肾等各器官取出后，置于50%磷酸缓冲甘油中，在－4°C或4°C的冰箱中保存备用。

**3.病原悬液制备** 取出甘油保存的材料，以无菌的0.65%氯化钠溶液洗3—4次（如系新鲜病鱼材料，则直接加入0.65%氯化钠溶液）使成10%($10^{-1}$)浓度。然后基本上按中国科学院水生生物研究所三室病毒组（1978）和Amend等（1973）的方法，但稍有改变，增加离心速度和时间（每分钟3000转，离心30分钟）。同时加入的青霉素、链霉素也稍为加大，前者为800—1000国际单位/毫升，后者为800—1000微克/毫升，室温处理2小时。此毒原供感染用。另一种是将上清液通过0.22—0.3微米孔径的微孔滤膜除菌后供青鱼腹腔注射和浸泡感染用。

**4.疫苗制备** 基本上按高汉娇等草鱼出血病疫苗制备方法（鱼病简讯，1980年第3期），但稍有改变。青霉素为1000国际单位/毫升，链霉素为1000微克/毫升，同时在组织捣碎后放入冰箱中过夜，第二天再充分搅拌，促使细胞破碎释放出病毒。

灭活后的疫苗都必须做安全试验和效果试验。

**5.感染方法** 注射感染：按每尾鱼从腹腔注入0.1—0.2毫升的$10^{-1}$或$10^{-2}$浓度的病原悬液。

浸泡感染：将鱼浸泡在$10^{-2}$浓度的滤过病原悬液中30分钟，然后将鱼移置在水温28°C的试验缸中试养。另设对照组，其饲养条件与试验组一致。

**6.病原悬液在鱼体内传代试验** 通过0.15微米孔径微孔滤膜的病原悬液（$10^{-1}$浓度）以每尾0.2毫升进行腹腔注射，注射后的鱼饲养在水温28°C的试验缸中。待鱼发病时，取其肝、脾、肾，用0.65%氯化钠溶液稀释成$10^{-1}$浓度，匀浆，以每分钟3000转速度离心30分钟制成病原悬液，再用0.15微米孔径滤膜过滤后对健康青鱼作腹腔注射。以此方法，反复在鱼体中传3—4代。每次各用5—11尾鱼供作试验和对照。

**7.肾组织病理检查** 光镜观察正常鱼和患出血病鱼各5尾的肾脏按常规操作：

Bouin's液固定，石蜡包埋，切片厚度5—7微米，H.E.染色。

电镜观察的3尾正常鱼和经人工感染后患出血病的5尾鱼肾脏均在冰浴上取材，用戊二醛预固定，再用锇酸固定，Epon 812包埋，常规超薄切片，染色观察。

## 结　果

**1.病原悬液对鱼体感染试验**　不论是加抗生素杀菌或通过微孔滤膜(0.3、0.22及0.15微米孔径）除菌的组织悬液均能使健康鱼感染发病，其显症率可达100%，死亡率则62.5—100%。经除菌的滤过液（$10^{-2}$浓度）不论是注射或浸泡感染，同样能使健康鱼感染发病。

鱼一般在感染后的第4天，鳍的末端开始变黑，不集群，分散独游，常浮游于水面不吃食，动作迟钝，继之体表呈暗黑色，有的在背鳍两侧出现两条浅色带，同时各鳍基部、脑腔、口腔、鳃、鳃盖骨下缘、眼眶有点状或丝状血斑，尤其是尾鳍充血较明显，鳍末端伴随坏死现象。此外，肛门、肌肉、皮下也会出现整片或点状出血斑，肠道全部或局部时有充血现象（但肠壁仍保持原有的韧性），而且肝脏、肠系膜也出现块状或点状血斑。以上症状并非在一尾鱼上同时发生。人工感染的病鱼症状与天然发病鱼的症状颇为相似。

感染试验中，有的鱼体虽有充血现象和鳍条发黑，边缘有坏死脱落现象并伴有"浮头"，但不死亡。这种鱼经10—11天后体色逐渐恢复正常，表现在所坏死部分也逐渐长好，鱼又开始正常摄食。因此，人工感染后的病鱼死亡率并非都是百分之一百。

一般而言，经病原悬液注射感染的鱼潜伏期比浸泡感染的缩短2天左右(见表1)。

**2.病原悬液在鱼体内传代试验**　除菌的滤过液在鱼体内传3—4代，其显症率仍较高（90—100%）（见表1），说明病毒能在鱼体内繁殖。病鱼的症状如前所述。

**3.部分检查正常与患出血病青鱼的肾脏**

（1）正常鱼的肾脏

青鱼的肾脏结构与鳙、鲩（草鱼）、鲢、鲮肾脏结构（徐豪、马淑懿，1983）较为相似。埋藏在含有很发达的肾脏造血组织细胞间质之中的肾小体（包括肾小球和肾小囊）、肾小管和集合管以松散盘绕的曲状管道分布。紧接肾小体的肾小管可分为颈段、近球段（管腔内游离缘有刷状缘）、间段及远球段。肾小管由单层上皮细胞组成，细胞为立方形、短柱形、高柱形和长柱形，细胞核一般呈扁圆形、圆形或椭圆形，且位于细胞的基部、亚中部和中部。

（2）患出血病青鱼的肾脏

光镜观察：整个肾脏组织细胞较模糊，肾小球已变形，细胞膨大；肾小管在不同程度上表现出病变，如管腔破坏，细胞排列不规则，极度肿大的上皮细胞呈圆或椭圆形，核萎缩或坏死，分布在细胞的一端；管腔上皮细胞出现空泡；管腔内的微绒毛坏死而无规则排列等。上述现象，在病鱼中均不同程度地出现。详见图1—10。

电镜观察：细胞较模糊，管腔内有异物，细胞内线粒体空泡化，同时造血组织细胞质中的包涵体内可见比较集中或分散的病毒颗粒，颗粒呈球形(直径为50—56毫微米)，

表 1　病原悬液对青鱼种感染及在鱼种体内传代试验　（水温28℃）

| 类别 | 毒源处理 | 试验组：鱼体浸泡 毒源浓度 | 鱼体浸泡 死亡开始日/最后死亡日 | 鱼体浸泡 显症率（%） | 鱼体浸泡 死亡率（%） | 腹腔注射 毒源浓度 | 腹腔注射 死亡开始日/最后死亡日 | 腹腔注射 显症率（%） | 腹腔注射 死亡率（%） | 对照组 显症率（%） | 对照组 死亡率（%） |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 加抗生素（青霉素1000单位/毫升<br>链霉素800微克/毫升） | | | | | $10^{-1}$ | | 90—100 | 90—100 | 0 | 0 |
| B | 0.3微米孔径的微孔滤膜过滤 | | | | | $10^{-1}$ | | 100 | 100 | 0 | 0 |
| C | 0.22微米孔径的微孔滤膜过滤 | $10^{-2}$ | 8/10 | 100 | 87.5—100 | $10^{-2}$ | 7/9 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| D | 0.22微米孔径的微孔滤膜过滤 | | | | | $10^{-2}$ | 7/9 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| E | 加抗生素（青霉素1000单位/毫升<br>链霉素1000微克/毫升） | $10^{-2}$ | 8/9 | 100 | 75 | | | | | 0 | 0 |
| F | 0.22微米孔径的微孔滤膜过滤 | $10^{-2}$ | 8-9/10-11 | 100 | 62.5 | $10^{-1}$ | 6/9 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| | | | | | | | 传代次数 | | | | |
| G | 0.15微米孔径的微孔滤膜过滤 | | | | | $10^{-1}$ | 1 | 90—100<br>100 | 90—100<br>90—100 | 0 | 0 |
| | | | | | | | 2 | 100<br>100 | 75—100<br>75—100 | 0 | 0 |
| | | | | | | | 3 | 100<br>100 | 100<br>100 | 0 | 0 |
| | | | | | | | 4 | 100 | 100 | 0 | 0 |

颗粒中央有一电子密度较高的核心（直径为25—30毫微米），在核心周围有一层约16毫微米的外膜(图 9 —10)。上述情况，在观察的 5 尾病鱼中均能见到。

**4.免疫效果**　从1981—1983年先后在松江、金山和青浦县共 7 个点进行室外生产性免疫试验（试验面积达101.26亩，不包括对照池面积；免疫注射鱼共 28514 尾），成活率一般可达60—90%，有的达96.5%（松江县张泽公社姚王大队养殖场）和98.98%（青浦县西岑公社养殖场）（见表 2）。

**表2　　1981—1983年松江、青浦和金山县青鱼免疫试验**

| 时间（年） | 地点 | 放养 月、日 | 放养 规格（尾/公斤） | 放养 免疫 池塘（亩） | 放养 免疫 数量（尾） | 放养 对照 池塘（亩） | 放养 对照 数量（尾） | 起捕 月、日 | 起捕 免疫 数量（尾） | 起捕 免疫 成活率（%） | 起捕 对照 数量（尾） | 起捕 对照 成活率（%） | 免疫组成活率是对照组成活率的倍数 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1981 | 松江佘山江秋大队养殖场 | 4、4 | 12.5 | 2.48 | 1500 | 2.55 | 1500 | 11、28 | 1218 | 81.20 | 426 | 28.40 | 2.86 |
| | 青浦西岑公社养殖场* | 4、20 | 12.5 | 1 | 1500 | 1 | 1500 | 11、7 | 928 | 61.80 | 384 | 25.60 | |
| | 青浦西岑公社养殖场 | 4、20 | 12.5 | | | 1 | 1500 | 11、7 | | | 343 | 22.80 | 2.76 |
| | 青浦西岑公社养殖场 | 4、20 | 12.5 | | | 1 | 1500 | 11、7 | | | 281 | 18.70 | |
| 1982 | 松江佘山江秋大队养殖场 | 3、31 | | 2.48 | 2050 | 2.55 | 2050 | 12、6 | 1543 | 75.28 | 708 | 34.54 | 2.18 |
| | 青浦西岑公社养殖场 | 2、19 | 12.5 | 1.8 | 2975 | 2.1 | 3425 | 12、10 | 1958 | 65.28 | 342 | 9.99 | 6.53 |
| 1983 | 松江佘山江秋大队养殖场 | 3、15 | 8 | 2.48 | 2500 | 2.55 | 2500 | 11、9 | 2133 | 85.32 | 1031 | 41.24 | 2.07 |
| | 松江佘山公社水产大队 | 3、27 | 23.5 | 2.8 | 2799 | 2.8 | 2800 | 12 | 2568 | 91.70 | 1650 | 58.90 | 1.56 |
| | 松江张泽姚王大队养殖场 | 3、19 | 12.5 | 2.08 | 1523 | | | 11、11 | 1417 | 93.50 | | | |
| | 青浦西岑公社养殖场** | 2、2 | 6 | 12.6 | 1008 | 5 | 400 | 11、15 | 861 | 85.42 | 157 | 39.25 | 2.81 |
| | 青浦西岑公社养殖场** | 2、2 | 6 | 12.2 | 976 | 9.8 | 767 | 11、15 | 912 | 93.09 | 206 | 26.85 | |
| | 青浦西岑公社养殖场** | 2、2 | 6 | 7.1 | 568 | 5.1 | 513 | 11、15 | 511 | 89.99 | 253 | 49.32 | |
| | 青浦西岑公社养殖场** | 2、2 | 6 | 9.1 | 728 | 6 | 481 | 11、15 | 717 | 98.98 | 207 | 43.04 | |
| | 青浦西岑公社养殖场** | 2、2 | 6 | 6.6 | 528 | | | 11、15 | 411 | 77.84 | | | |
| | 青浦解放公社养殖场 | 3、27 | 25 | 3.5 | 3200 | | | 12 | 2256 | 70.50 | | | |
| | 金山兴塔公社水产大队 | 3、7 | 9 | 11.42 | 1969 | 9.08 | 1771 | 11、30 | 1795 | 91.00 | 990 | 56.00 | 1.63 |
| | 金山县水产养殖场 | 3、7 | 11<br>22 | 10 | 1760 | | | 11、17 | 1633 | 92.78 | | | |

* 该四口池塘系上海市水产所池塘养殖室的试验塘，数据由该室提供。

**对照组的起捕时间为12月12日。

# 讨 论

根据国外文献报道，分离鱼类病毒时制备的组织悬液一般是经过0.45微米孔径的微孔滤膜过滤，也有用0.22微米孔径的滤膜过滤的（Amend，1973）。本工作是采用0.3、0.2和0.15微米三种孔径的微孔滤膜过滤的。上述三种滤液都能使健康青鱼感染发病，病原能在鱼体中传3—4代，显症率仍很高，这就表明病原能在鱼体内繁殖。另外，从被检查的五例病鱼的肾脏组织中都能找到病毒颗粒，而三例对照鱼的肾脏中则没有发现。工作中曾将0.22微米孔径微孔滤膜的滤液经每分钟4万转速度离心2小时后取其沉淀，这时不但在电镜下可看到病毒颗粒，而且将其沉淀再感染健康青鱼时，鱼又能发病，取病鱼肾脏超薄切片后，在电镜下仍可见到病毒颗粒。因此，证明青鱼出血病是由一种病毒所引起的疾病。这种直径为50—56毫微米的病毒颗粒，目前对它的性质了解得还不多。但可以这样认为，青鱼的病毒颗粒仅在肾脏造血组织细胞质中的包涵体内发现，这与Plumb（1974）只在脾脏细胞中的细胞核内发现CCV（斑点叉尾鮰病毒，又叫河鲶病毒Channel catfish virus)颗粒有所不同，而且病毒颗粒的形态上也有差异。然而，青鱼出血病的症状与CCV、病毒性出血腐败病VHS（Viral hemorrhagic septicemia）及从草鱼中分离出一种弹状病毒病（Rhabdovirus grass carp）所引起鱼致病后的症状比较相似，但病原却有所不同（中国科学院水生生物研究所三室病毒组、武汉大学病毒研究所电镜室，1980；陈燕燊、江育林，1983；Ahne，1975；Wolf 和 Mann，1980）。尽管青鱼出血病与草鱼出血病症有相似之处，但它们之间有何异同，则有待于进一步研究。

在青鱼生产性试验中，各试验点的青鱼种成活率有所不同，有的成活率很高，有的不太高，这与饲养管理条件的好坏和鱼种健康程度存在个体差异等种种原因有关。饲养管理条件不当，常可引起其它疾病使鱼致死，进而影响成活率。

作为青鱼的肾脏，它是重要的排泄器官，各个部位的细胞相互协调一致，达到维持鱼体的正常代谢。另方面，青鱼的肾脏也是病毒攻击的重要靶器官。从光镜及电镜观察青鱼患出血病的肾脏所出现的各种病变，就是一个最好的证明。肾小管中的近球段管腔内缘，由许多具有活跃的重吸收机能的微绒毛（徐豪、马淑懿，1983）组成的刷状缘，由于微绒毛坏死（图8），造成鱼体的代谢发生障碍。特别是肾间质造血组织细胞中的线粒体，它是细胞质中的重要细胞器，能量转换的中心，即细胞的动力站。一旦动力站受损或破坏（如线粒体出现空泡），势必直接或间接地严重影响肾脏的正常生理机能，进而危及整个机体，最后导致青鱼死亡。

发现鱼类病毒病后，必须进行防治。据知，国外对鱼类病毒病的防治较困难，即使找到有效药物，昂贵的价格也难以用于生产。随着病毒病研究的进展，对鱼类病毒病的控制和采取免疫途径早已引起一些鱼类病毒学家(Amend，1976；Gould，1978)的关注。1976年，Fryer 等培育出 IHNV 减毒株，并在室内进行浸泡免疫试验，结果表明免疫的鱼在攻击后成活率可达72—86%，而对照组只有6%。目前，国外鱼类病毒病的防治，大都是当发现鱼有病时则及时进行全部消毁或彻底消毒。虽然疫苗（灭活和减毒）在室内曾进行了许多试验，可惜至今仍未在生产上应用。本工作过程中曾对青鱼种采用

免疫注射，初步取得了60—90%（个别为98、98%）的成活率。这就表明，为防止青鱼出血病的发生而进行的人工免疫注射方法是目前生产上行之有效的方法。

## 参 考 文 献


王德铭 1956 青鱼赤皮病致病菌的初步研究。水生生物学集刊（1）：1—18

王德铭 1958 鲩、青鱼烂鳃及赤皮病致病菌的研究。水生生物学集刊：9—25

中国科学院水生生物研究所第三室病毒组 1978 草鱼出血病病原的研究。水生生物学集刊6（3）：321—330。

中国科学院水生生物研究所第三室病毒组、武汉大学病毒研究所电镜室 1980 草鱼出血病病原的研究 Ⅱ、电镜观察。水生生物学集刊 7（1）：75—80

徐森、马淑霞 1983 四种淡水养殖鱼肾组织的细微结构。中山大学学报（自然科学版）（2）：129—134

翟子玉等 1982 对青鱼出血病的初步试验。水产科技情报（1）：10—11

孙建中等 1981 青鱼肠炎病、出血病的免疫。水产科技情报（3）：20—21

陈燕燊、江育林 1983 草鱼出血病病毒形态结构及其理化特性的研究。科学通报（18）：1138—1140

Amend, D. F. *et al.*, 1973 An improved method for isolating viruses nfrom asymtomatic carrier fish. *Frans. Amer. Fish. Soc.* 101 (2):266—269

Amend, D. F. 1976 Prevention and control of viral disease of salmon. *J. Fish. Res. Board. Can.* 33 (4):1059—1066

Ahne. W. 1975 A rhabdovirus isolated from grass carp (*Ctenogharyngodn idellus*). *Arch. Virol.* 48:181—185

Fryer. J. L. *et al.*, 1976 Vaccination for control of infections disease in pacific salmon. *Fish pathology* 10 (2):155—164

Gould, R. W. *et al.*, 1978 Spray vaccination: A method for the immunization of fish. *Fish Pathology* 13 (1):63—68

Plumb, J. A. *et al.*, 1974 Histophathology and electron microscopy of channel catfish virus in infected channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Biol.* 6:661—664

Wolf, K. and J. A. Mann 1980 Poikilotherm verteibrate cell linesand viruses: a current listing for fishes. *In Vitro* 16 (2):168—169

# VIRAL HEMORRHAGIC DISEASE OF BLACK CARP (*MYLOPHARYNGODON PICEUS*)

Zhai Ziyu Ko Hongwen Yu Haoxiang Gu Zhennan
Li Xiuzhen Cao Shugin
(*Shanghai Fisheries Research Institute*)

Gong Mingyao
(*Shanghai Fisheries Extension Station*)

The black carp is one of the commercially important freshwater farming fish in China. Among diseases, the most serious damage to the 2-year fingerlings of black carp is the hemorrhagic disease. This disease has been epidemic mainly in Jiangsu, Zhejiang provinces and the surburb of Shanghai. The incidence of this disease becomes serious when the water temperature is 28°—33°C. Usually, the survival rate of fingerlings of black carp is about 20%. We have carried out research work on this disease since 1980.

The symptoms are dark in color onbody and fins, some various degree of hemorrhage on body surface and on different interior organs. The clinical signs of artificial infection is similar to the natural diseased fish. Pathologic examination of kidney tissue shows different degrees of destruction, in which virus particles are obviously observed, concentrating or dispersing in haemapoietic cytoplasm. The virus particle is spherical. Its diameter is ranging from 50—56nm. The thickness of an outer coat is about 16nm.

The experimental immunization practised for three years reveals that the survival rate is remarkably raised to 60—90%. The effect is quite stable (Table 2).

Key words Black carp Hemorrhagic disease viral

**图版Ⅰ** 患出血病的青鱼肾脏（光镜观察）

图1　肾小管细胞排列不规则，细胞轮廓不清，细胞核膨大。×1000

图2　管腔上皮细胞极度肿大。×1000

图3、4　管腔上皮细胞极度肿大，排列不规则，且细胞内出现空泡。×1000

图5　管腔上皮细胞极度肿大，呈分散状态地分布。×440

图6　管腔上皮细胞空泡化，呈多层排列。×1000

图7　管腔内有异物，×1000

图8　管腔内的纤毛坏死。×1340